

rea alternativei viabile a valvelor cardiace artificiale, utilizând metodele ingineriei tisulare, permite înlăturarea dezavantajelor protezelor valvulare existente.

Valvele cardiace create prin ingineria tisulară reprezintă un țesut viabil cu capacitatea de a crește împreună cu vârsta, care este un argument indiscutabil pentru implementarea clinică în chirurgia cardiacă pediatrică.

### Summary

An ideal heart valve substitute should possess the following requirements: absolute biocompatibility, long-term durability, nature-like biomechanical properties, no thrombogenicity, no teratogenicity, sufficient availability in all common sizes, and moreover, particularly for pediatric patients the growth potential is crucial. The use of current available biological cardiac prostheses such as glutaraldehyde fixed xenovalves and aortic or pulmonary homografts is unfortunately limited for several reasons. Further developments towards the alternative biological valves prostheses based on biological cell-free matrices as ideal valve substitute using methods of tissue engineering would potentially abolish the known disadvantages of current valve prostheses.

Tissue engineering heart valve represents a viable tissue with the ability to grow, which is a strong argument to further evaluate this concept especially for clinical application in pediatric cardiac surgery.

## ACTUALITĂȚI ÎN PREZERVAREA ȘI APLICAREA CLINICĂ A HOMOGREFELOR ÎN POZIȚIE AORTICĂ

**Sergiu Barnaciuc, IMSP Centrul de Chirurgie a Inimii**

Valvele cardiace umane recoltate de la cadavre (homogrefe) (*fig. 1*) sunt folosite ca substituenți ale valvelor cardiace afectate încă din anii '60 ai secolului trecut, deoarece comparativ cu valvele mecanice și protezele biologice xenogene, alogrefa cardiacă umană este considerată superioară, datorită performanțelor sale hemodinamice, rezistenței sporite la infecție, complicațiilor trombotice minime și nu necesită terapie anticoagulantă de durată. Totodată, marile dezavantaje și folosirea limitată a homogrefelor sunt cauzate de tehnica chirurgicală complicată de implantare și de durabilitatea limitată de lungă durată, mai ales la copii.

Substituenții mecanici și biologici ai valvelor cardiace au evoluat în paralel începând cu anul 1951, când Hafnagel a aplicat prima proteză mecanică în aorta descendentă, însă fără succes [1, 3].

În 1952, Lam introduce conceptul folosirii alografei cardiace umane. Cinci ani mai târziu Murray, folosind experiențele lui Lam, a implantat o alogrefă în aorta descendentă, micșorând, astfel, insuficiența valvei aortice [2, 3].

În anii '60 au fost implementate valvele cu bilă de către Starr, iar în 1962 a fost efectuată prima înlocuire a valvei aortice cu alogrefă în poziție ortotopică de către D. Ross (Anglia) și independent de către Barratt-Boyes (Australia) [5,7]. Tehnica chirurgicală a fost descrisă de Duran și Gunning [2, 4]. La această etapă circulația extracorporală era la început de cale, fapt care cerea o mare măiestrie și experiență a chirurgului în aplicarea unei homogrefe, fiind tehnic mai complicată comparativ cu implantarea unei proteze mecanice.

În 1962 începe aplicarea clinică a homogrefelor crioprezervate. Accesul limitat la materialul cadaveric proaspăt și alegerea strictă a recipientului de valvă a atras după sine elaborarea unor metode de prelevare, sterilizare și păstrare a valvelor. Folosirea dezinfectanților, ca clorhexidina, etilenoxidul,  $\beta$ -propiolactona, formaldehida și  $\gamma$ -iradierea, dovedeau o sterilizare adecvată, înghețarea în carbon-dioxid la  $-70^{\circ}\text{C}$  permitea păstrarea mai îndelungată a homogrefelor. Mai târziu aceste metode s-au dovedit a fi ineficiente, deoarece sub acțiunea factorilor enumerați mai sus se distrugea componentul celular, se denaturau proteinele și se altera substanțial matricea extracelulară. La această perioadă

valvele mecanice și bioprotezele xenogene s-au dezvoltat vertiginos, îmbunătățindu-și proprietățile hemodinamice, devenind populare [5,8,10].

Acumulând experiență în aplicarea homogrefelor, cardiocirurgii s-au întâlnit cu o altă problemă a valvelor biologice – degenerarea, care a dat un nou imbold perfecționării metodelor de sterilizare și preservare a homogrefelor. De către Barratt-Boyes în 1968 a fost propusă metoda sterilizării cu antibiotice. Un pas important a constituit folosirea metodei crioprezervării homogrefelor în nitrogen lichid în prezența dimetilsulfoxidului, ce permite păstrarea până la 5 ani [7,11].

În funcție de modul de colectare, sterilizare și preservare a homogrefelor, ele pot fi divizate în IV tipuri:

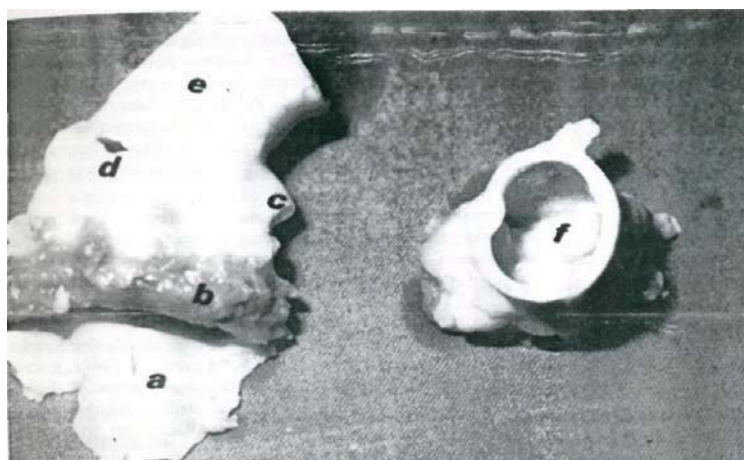
1. Homovitale, colectate în condiții de maximă sterilitate și plasate imediat în mediu de cultură tisulară 199 cu doze mici de antibiotice pentru menținerea viabilității celulelor endoteliale. Homogrefele homovitale necesită implantare cât mai precoce.

2. Sterilizate în antibiotice - colectate de la donori de multiorgane sau postmortem până la 72 ore, fiind sterilizate în concentrații mari de antibiotice timp de 24 de ore la temperatura de 37,0°C ce pot fi păstrate până la 6 săptămâni la temperatura de + 4° C.

3. Crioprezervate - valve de acum sterilizate supuse înghețării controlate -1°C/min în prezența sol 10% de dimetilsulfoxid (DMSO) - un crioprotector ce previne formarea cristalelor intracelulare și intercelulare de gheață. Păstrarea la -140° C este posibilă până la 5 ani.

4. Decelularizate - o metodologie nouă de creare a valvelor cardiace umane, folosind conceptul ingineriei tisulare: înlăturarea celulelor donatorului de pe complexul valvular cu obținerea matricei tisulare, care ulterior in vitro sau in vivo se repopulează cu celulele recipientului. Conceptul ingineriei tisulare a valvelor cardiace a fost introdus de Shinoka în 1995 [21,22].

Cu toate prioritățile homogrefelor comparativ cu valvele mecanice și biologice, ca performanța hemodinamică, rezistența la endocardită, complicații trombotice minimale și eliberarea de terapia anticoagulantă a pacienților care au suportat implant de homogrefă, există și laturi negative, ca disponibilitatea limitată, durabilitatea limitată în timp și metodologia complicată a implantării [18].



*Figura 1. Homogrefa aortică*

- a) cuspa mitrală anterioară
- b) segmentul miocardial al inelului aortic
- c) sinusul Valsalva cu artera coronară stângă
- d) sinusul Valsalva cu artera coronară stângă
- e) joncțiunea sinotubulară cu un segment al aortei ascendente
- f) partea internă a rădăcinii aortei

### **Importanța viabilității celulare**

Viabilitatea reprezintă abilitatea complexului valvular de a-și îndeplini funcția fiziologică. Este rezonabil a presupune că dacă valva este vie, ea poate să-și mențină structura și funcția pe o perioadă lungă de timp.

Singurele determinante ale viabilității pe termen îndelungat a valvei este calitatea și stabilitatea matricei extracelulare și a scheletului de colagen. Totuși studiile mai recente dovedesc că viabilitatea înalt celulară a valvei preimplantate este cheia succesului de viabilitate de lungă durată a homogrefei (*tab. 1*). Această afirmare este bazată pe faptul că celulele interstițiale ale valvei, în special fibroblaștii, posedă capacitatea de a menține integritatea funcțională și structurală prin sinteză continuă și remodelare a matricei extracelulare fibrilare și amorfe.

*Tabelul 1*

### **Metode de apreciere a viabilității**

<i>Teste de viabilitate</i>	<i>Complexul testat</i>
Prostaciclin/eliberarea oxidului nitric	Celule endoteliale
Proliferarea in vitro/vivo	Fibroblaști+celule endoteliale
Morfologia	Morfologia valvei
Cultura de celule	Fibroblaști+celule endoteliale
Sinteza proteinelor	Fibroblaști

Teoria viabilității a fost bazată, totodată, pe doctrina privilegiului imunologic. Celulele endoteliale conțin complexul de histocompatibilitate major de Cl I și II, formând o suprafață imunogenică, ceea ce presupune un răspuns imun al gazdei, deci celulele vii la transplantare nu vor funcționa pe durată lungă. Alternativa este faptul că celulele endoteliale și fibroblaștii gazdei pot crește în/sau pe cuspa structural intactă, schimbând cu locul celulele neviabile. Deci important este păstrarea viabilității cuspei ca matrice. O cuspă cu membrana bazală intactă poate permite celulelor gazdei să o repopuleze [18].

### **Factori ce pot afecta viabilitatea**

1. Ischemia până la implantare poate fi divizată în două tipuri:
    - ischemia caldă - timpul de la deces până la recoltare optimal ar fi de 1-12 ore postmortem, după Niwaya timpul mediu de 8,7ore după deces asigură o bună viabilitate a fibroblaștilor;
    - ischemia rece - timpul de la prelevare până la implantare.
  2. Sterilizarea cu antibiotice. Majoritatea autorilor folosesc pentru sterilizare cocktailul de antibiotice antimicotice, care are efect negativ asupra viabilității celulelor valvulare.
  3. Prezervarea - păstrarea de lungă durată în funcție de metoda folosită poate duce la afectări ireversibile celulare și la remodelarea structurii de colagen a matricei extracelulare.
- Sterilizarea cu doze mici de antibiotice și crioprezervarea au fost recunoscute ca cele mai bune metode de păstrare a viabilității de lungă durată a homogrefelor în 1987 la Întrunirea Internațională în problema Homogrefelor de la Berlin.

Indicațiile pentru implantarea homogrefelor în poziție aortică pot fi divizate în:

1) patologii congenitale:

- stenoza și insuficiența valvei aortice;
- tunelul ventricul stâng-aortă;
- truncus arteriosus;
- sindromul Marfan;
- transpoziția marilor vase.

2) patologii dobândite:

- endocardita bacteriană;
- abcese perianulare ale rădăcinii aortei; (*fig. 2*)
- afecțiuni reumatice ale valvei aortice.

Aici pot fi incluse, de asemenea, patologii care au fost operate în antecedente și necesită reoperație, ca: dilatarea cu balon a valvei aortice, stenoza și insuficiența aortică operată cu dilatări ale

inelului aortic tip Konno-Rastan, leak-ul paraprotetic, procedura David, implant de homogrefă. Tehnica „freehand” subcoronariană este folosită, în special, la afectările cuspelor valvei aortice [17].

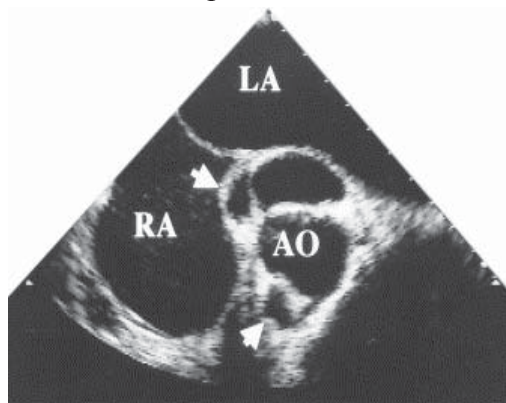


Figura 2. Abces perianular al rădăcinii aortei (imagine EcoCG)

### Tehnici chirurgicale de implantare

În funcție de nivelul afectării complexului valvular aortic diferă și tactica chirurgicală aplicată. La moment sunt aplicate două tipuri de tehnică chirurgicală. În cazul afectării inelului fibros aortic (fig. 2) este folosită tehnica de schimbare a rădăcinii aortei propusă de Donald Ross în 1972 și perfecționată de Somerville și Ross în 1982 și McKowen în 1987 [9,19].

Operația Ross [figura 3] - folosirea homogrefei autologe (autograft) pulmonare în poziție aortică este o operație de elecție în viciile congenitale, în special la copii. A fost descrisă prima dată în 1967. Această operație nu a avut o răspândire largă din cauza tehnicii complicate de executare. Reîntoarcerea la operația Ross a avut loc în anii '90, după compararea rezultatelor de lungă durată cu protezele valvulare mecanice și posibilitățile de creștere a homogrefei o dată cu copilul [20].

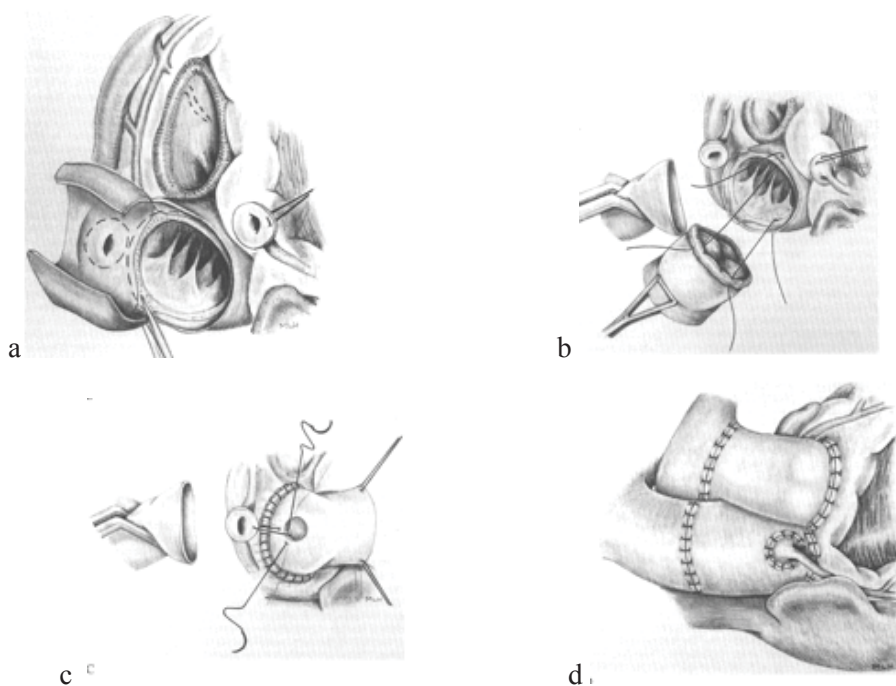


Figura 3. Operația Ross

- a) excizia aortei și arterei pulmonare împreună cu aparatul valvular și prepararea butoanelor arterelor coronare
- b) implantarea conduitului autolog pulmonar în poziție aortică
- c) reimplantarea arterelor coronare
- d) implantarea homogrefei decelularizate în poziție pulmonară

În clinica noastră au fost efectuate 4 operații tip Ross pe parcursul ultimilor doi ani cu rezultate bune. Pacienții se află în grupul de studiu și se examinează la fiecare 3 luni.

Implementarea ingineriei tisulare pentru crearea unui nou tip de valve –homogrefe decelularizate și folosirea lor cu succes în practica cardiocirurgicală, în special, în poziție pulmonară a dezvoltat ideea decelularizării homogrefelor aortale. Studiul experimental a fost efectuat în comun de Clinica de Chirurgie a Inimii din Chișinău și Centrul de Cardiocirurgie din Hannover, Germania. Conduitul valvular aortal uman a fost decelularizat folosind mixtura de doi detergenți. Controlul imunohistochimic, microscopia electronică și determinarea DNA rezidual au demonstrat o decelularizare calitativă, menținând structurile de bază și arhitectonica matricei valvulare intacte, ceea ce permite folosirea homogrefelor aortale decelularizate în clinică [21, 22].

### Concluzii

Aplicarea homogrefelor în poziție aortală este o metodă eficientă și indicată, în special în patologia infecțioasă a complexului valvular aortic, în patologii congenitale cu afectarea valvei aortice și a tractului de eiecție a ventriculului stâng, precum și în valvulopatiile reumatismale aortice, asociate cu inel aortic îngust. Rezultatele postoperatorii depind de un șir de factori ce acționează asupra stării homogrefei implantate, ca perioada ischemiei până la recoltare, metodele de sterilizare și prezervare, vârsta pacientului recipient și, nu în ultimul rând, de experiența chirurgului operator.

### Bibliografie selectivă

1. Dossche K.M., Defauw J.J., Ernst S.M., Craenen T.W., De Jongh B.M., Riviere A.B., *Allograft aortic root replacement in prosthetic aortic valve endocarditis. A review of 32 patients*. Ann Thorac Surg., 1997; 63:1644–49.
2. Dearani J.A., Orszulak T.A., Schaff H.V., Daly R.C., Anderson B.J., Danielson G.K., *Results of allograft aortic valve replacement for complex endocarditis*. J Thorac Cardiovasc Surg., 1997; 113: 285–91.
3. VanHooser D.W., Johnson R.G., Hein R.A., Elkins R.C., *Successful management of aortic valve endocarditis with associated periannular abscess and aneurysm*. Ann Thorac Surg., 1986; 42: 148–51.
4. Oswalt J., *Management of aortic infective endocarditis by autograft valve replacement*. J Heart Valve Dis., 1994; 3: 377–9.
5. Vogt P.R., Segesser L.K., Jenni R. et al., *Emergency surgery for acute infective aortic valve endocarditis. Performance of cryopreserved homografts and mode of failure*. Eur J Cardiothorac Surg., 1997; 11:53–61.
6. Kirklin J.K., Kirklin J.W., Pacifico A.D., *Aortic valve endocarditis with aortic root abscess cavity; surgical treatment with aortic valve homograft*. Ann Thorac Surg., 1988; 45:674–7.
7. Haydock D., Barratt-Boyes B., Macedo T., Kirklin J.W., Blackstone E., *Aortic valve replacement for active infectious endocarditis in 108 patients: a comparison of freehand allograft valves with mechanical prostheses and bioprostheses*. J Thorac Cardiovasc Surg., 1992; 103:130–9.
8. Vesely I., Gonzales-Lavin L., Graf D., Boughner D., *Mechanical testing of cryopreserved aortic allografts*. J Thorac Cardiovasc Surg., 1990; 99:119–23.
9. Matsuki O., Robles A., Giggs S., Bodnar E., Ross D.N., *Long-term performance of 555 aortic homografts in the aortic position*. Ann Thorac Surg., 1988; 46:187–91.
10. Hasegawa J., Kitamura S., Niwaya K., Kawachi K., Kawata T., Kameda Y., *Echocardiographic characteristics of the cryopreserved allograft aortic valve replacement assessed by intraoperative transesophageal echocardiography*. Cardiovasc Surg., 1996; 4:293–8.
11. Santangelo K., Elkins R.C., Stelzer P. et al., *Normal left ventricular function following pulmonary autograft replacement of the aortic valve in children*. J Cardiac Surg., 1994; 6 suppl.:633–7.
12. Elkins R.C., Knott-Craig C.J., Ward K.E., McCue C., Lane M.M., *Pulmonary autograft in children: realized growth potential*. Ann Thorac Surg., 1994; 57: 1387–94.



13. Gerosa G., McKay R., Ross D.N., *Replacement of the aortic valve or root with a pulmonary autograft in children*. Ann Thorac Surg., 1991; 51:424–9.
14. Elkins R.C., Santangelo K., Stelzer P., Randolph J.D., Knott-Craig C.J., *Pulmonary autograft replacement of the aortic valve: an evolution of technique*. J Cardiac Surg., 1992; 7:108.
15. Edmunds L.H., Clark R.E., Cohn L.H., Grunkemeier G.L., Miller D.C., Weisel R.D., *Guidelines for reporting morbidity and mortality after cardiac valvular operations*. Ann Thorac Surg., 1996; 62: 932–5.
16. Korzeniowski O.M., Kaye D., *Infective endocarditis*. In: E. Braunwald Editor. Heart disease, ed 4, vol 2, WB, Saunders, Philadelphia, 1992:1078–1105.
17. O'Brien M.F., Stafford E.G., Gardner M.A.H. et al., *Allograft aortic valve replacement: long-term follow-up*. Ann Thorac Surg., 1995; 60:565–70.
18. Song Y.C., Yao L.Y., Kneebone J.M., Lupinetti F.M., *Effect of cryopreservation and histocompatibility on type I procollagen gene expression in aortic valve grafts*. J Thorac Cardiovasc Surg., 1997; 114: 421–7.
19. Yankah A.C., *Surgical management of infective endocarditis: pulmonary autograft or allograft?*. J Heart Valve Dis., 1994; 3:380–3.
20. Elkins R.C., Knott-Craig C.J., Ward K.E., Lane M.M.: *The Ross operation in children: 10 years experience*. Ann Thorac Surg., 1998; 65:496–502.
21. Cebotari S., Mertsching H., Kallenbach K., Kostin S., Repin O., Batrinac A., Kleczka C., Ciubotaru A., Haverich A., *Construction of Autologous Human Heart Valves Based on an Acellular Allograft Matrix*. Circulation, 2002; 106:I-63.
22. Tudorache I., Cebotari S., Lichtenberg A., Barnaciuc S., Cheptanaru E., Batrînac A., Repin O., Ciornîi A., Ciubotaru A., Haverich A., *Tissue engineering of heart valves: An efficient method for decellularization of human aortic valve conduits*. Thorac cardiovasc Surg., 2006; 54.

### Rezumat

Problema creării unui substituent valvular cardiac ideal nu este rezolvată până în prezent. Pe parcursul dezvoltării chirurgiei cardiace se observă o evoluție paralelă a protezelor cardiace mecanice, biologice xenogene, care și-au îmbunătățit proprietățile hemodinamice, și a grefelor valvulare umane (homogrefe), care au o rezistență sporită la infecții, complicații trombotice minime și eliberează pacienții de terapia anticoagulantă.

Rămân discutabile însă unele probleme ce au apărut pe parcursul acumulării experienței în implantarea homogrefelor, așa ca alegerea optimă a metodei de sterilizare și preservare, a tehnicii operatorii, ceea ce se răsfrânge asupra durabilității pe termen lung a grefelor implantate. Implementarea ingineriei tisulare în crearea valvelor cardiace deschide noi orizonturi pentru activitatea experimentală și clinică, fiind promițătoare în perspectivă.

### Summary

The problem of the creation of one substitution ideal cardiac valve is not solved till now. During the development of heart surgery a parallel evolution of mechanical heart valve prosthesis is observed, biological xenogen valve prosthesis which is improving the hemodynamic property and the homograft valve has a efficient resistance to infection, minimal thrombosis complication, is liberating patients from anticoagulation therapy.

Some problems remain questionable which appear during getting experience in implantation of homograft and so the selection of an optimal method of sterility and preserving the surgical technique, which is reflecting on duration of long term of implanted graft. The implementation of tissue engineering in the creation of heart valves opens a new sphere in experimental and clinical activity promoting good results.